

Clonagem em ruminantes: progressos e perspectivas atuais

Cloning in ruminants: progress and current perspectives

A.F. Pereira, V.J.F. Freitas¹

Laboratório de Fisiologia e Controle da Reprodução, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil.

¹Correspondência: vjff@pq.cnpq.br

Resumo

Desde o nascimento da ovelha Dolly, grupos de pesquisas têm empregado a técnica de transferência nuclear (TN) ou clonagem para a produção de embriões e crias em diferentes espécies de ruminantes. Em geral, a transferência nuclear consiste em transferir núcleos de células doadoras para o interior de oócitos enucleados, resultando na produção de indivíduos geneticamente idênticos ao animal doador de núcleo. Contudo, a eficiência da técnica ainda é baixa devido a inúmeros fatores. Assim, o objetivo deste trabalho é realizar uma revisão sobre a transferência nuclear em suas várias etapas, destacando os principais fatores que interferem no seu sucesso e discutir as perspectivas atuais provenientes do surgimento de metodologias e adaptações aos protocolos experimentais.

Palavras-chave: transferência nuclear, ruminante, embrião reconstruído, células somáticas.

Abstract

Since the birth of Dolly, research groups have employed the nuclear transfer (NT) or cloning to embryo and offspring production in many ruminant species. In general, this technique consists on nuclear transfer of donor cells into enucleated oocytes, resulting on the production of genetic identical individual to the nucleus donor animal. However, there are many factors that reduce the efficiency of this technique. Thus, the objective of this manuscript is to describe several steps of the technique with emphasis to the main factors that interfere on its success and to discuss current perspectives considering some new approaches in the methodology and experimental protocols.

Keywords: nuclear transfer, ruminant, reconstructed embryo, somatic cells.

Introdução

Durante várias décadas, diferentes grupos de pesquisa, buscando conhecer os aspectos fisiológicos e embrionários envolvidos na reprodução, bem como obter descendentes de animais geneticamente valiosos, estudaram a utilização de um conjunto de biotécnicas como ferramentas para a realização de tais objetivos. Seguindo esta temática, biotécnicas de última geração foram desenvolvidas, em especial, a transferência nuclear (TN) ou clonagem. O princípio da técnica reúne-se em duas etapas: a primeira consiste na utilização de oócitos como citoplasma receptor após o processo de enucleação, enquanto a segunda consiste em reconstruir o embrião e transferi-lo para uma receptora sincronizada.

A transferência nuclear foi originalmente proposta por Spermann (1938), sendo utilizada como ferramenta para conhecer o papel do material genético na diferenciação celular em anfíbios. Posteriormente, Briggs e King (1952) realizaram a primeira transferência nuclear em anfíbios e, subsequentemente, Gurdon e Uehlinger (1966) demonstraram o potencial de reprogramação de células diferenciadas utilizando *Xenopus* adultos. Em mamíferos, o desenvolvimento da transferência nuclear ocorreu lentamente, sendo somente descrita a partir de 1975 em coelhos (Bromhall, 1975). Posteriormente, a técnica pode ser realizada em espécies de ruminantes, tais como ovinos (Willadsen, 1986) e bovinos (Prather et al., 1987), sendo esses animais clones produzidos a partir da utilização de blastômeros como fontes doadoras de núcleos.

Partindo da necessidade de aperfeiçoar a técnica, estudos subsequentes permitiram verificar que células completamente diferenciadas poderiam ser usadas em programas de transferência nuclear. O ápice desta afirmativa aconteceu quando do nascimento da ovelha Dolly, o primeiro mamífero clonado por esta técnica (Wilmut et al., 1997). Posteriormente, o sucesso em outras espécies de ruminantes foi alcançado, já tendo sido observado em bovinos (Cibelli et al., 1998; Kato et al., 1998), caprinos (Baguisi et al., 1999), gaur (Lanza et al., 2000), bubalinos (Shin et al., 2007) e cervos (Berg et al., 2007). Em camelídeos, esta biotécnica apresenta-se promissora, já tendo sido descrita em lhamas a produção de embriões oriundos de transferência nuclear utilizando fibroblastos adultos como doadores de núcleo (Sansinena et al., 2003).

Dentre as várias aplicações da técnica, podem ser citadas aquelas que visam conhecer a interação núcleo-citoplasma na reprogramação nuclear. Além disso, a transferência nuclear atende a programas de

melhoramento genético, pela multiplicação de animais com características genéticas desejáveis. A técnica também se apresenta como uma ferramenta para uso com técnicas de transgênese a partir da utilização de linhagens celulares que receberam genes específicos (Behboodi et al., 2002), tornando-se uma alternativa viável para a produção de animais transgênicos quando comparada aos métodos convencionais (ex.: microinjeção pró-nuclear (Freitas et al., 2007a). Dessa forma, a transferência nuclear pode servir para a produção de animais transgênicos portadores de proteínas recombinantes que auxiliariam em novas alternativas de tratamento em humanos (Freitas, 2006; Freitas et al., 2007b). Outra aplicação da transferência nuclear é seu uso na conservação e na regeneração dos recursos genéticos.

Apesar de vários estudos sobre o assunto, a transferência nuclear ainda apresenta baixa eficiência, além de complicações observadas nos produtos obtidos. Desta maneira, esta revisão apresenta como propósito conceituar a transferência nuclear em suas várias etapas, destacando os principais fatores que interferem no seu sucesso, buscando compreender os diferentes eventos envolvidos e evidenciando recentes avanços obtidos em ruminantes.

Técnica de transferência nuclear

A produção de ruminantes pela técnica de transferência nuclear envolve múltiplas etapas cada uma podendo influenciar diretamente no resultado final. De forma sucinta são as seguintes as principais etapas do processo: seleção e preparo de citoplastos receptores adequados, seleção e cultivo de células doadoras de núcleo, reconstrução embrionária compreendendo as etapas de fusão e ativação celular, cultivo dos embriões reconstruídos e transferência dos mesmos (Fig. 1).

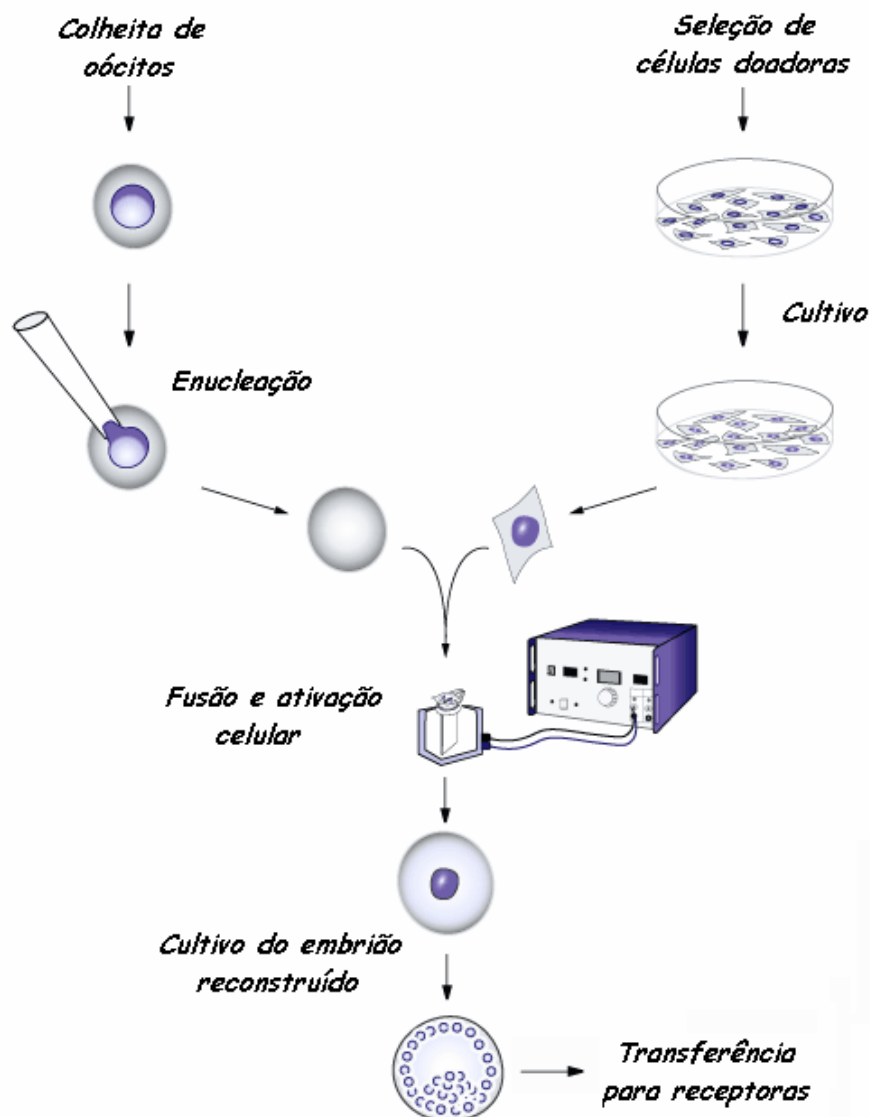


Figura 1. Apresentação esquemática dos diferentes eventos da transferência nuclear em ruminantes.

Seleção e preparo de citoplastos receptores

A fonte e a qualidade do citoplasma receptor (citoplasto) representam fatores importantes para o sucesso da técnica de transferência nuclear. Neste sentido, vários estudos já foram desenvolvidos buscando avaliar o estágio nuclear adequado deste citoplasto receptor em programas de transferência nuclear (Tab. 1). Contudo, diferentes estudos têm demonstrado que oócitos em metáfase II (MII) são mais adequados para suportar a reprogramação nuclear quando comparados aos demais estádios de desenvolvimentos já empregados (Zou et al., 2001; Lee et al., 2007). Por esta razão, a maioria das pesquisas relata o uso de oócitos em MII maturados *in vivo* (Ohkoshi et al., 2003) ou *in vitro* (Zhou et al., 2007) como o citoplasto de escolha.

Tabela 1. Momento da enucleação de citoplastos receptores para reconstrução embrionária em diferentes espécies de ruminantes.

Estádio nuclear	Espécie	Referência
Anáfase-telófase I	Ovinos	Campbell et al. (1996); Wilmut et al. (1997)
Metáfase II	Bovinos	Kato et al. (2000); Do et al. (2001)
Metáfase II	Camelídeos	Sansinena et al. (2003)
Telófase II	Bovinos	Bordignon e Smith (1998)
Telófase II	Caprinos	Baguisi et al. (1999)
Embrião pró-nuclear	Bovinos	Prather e First (1990)
Embrião duas células	Ovinos	Wells et al. (1997)

Fonte: Adaptado de Campbell et al., 2005.

O uso de oócitos maturados *in vitro* apresenta uma série de vantagens quando comparados àqueles maturados *in vivo*. Tem sido demonstrada uma variedade de fatores que interferem negativamente sobre a qualidade de oócitos maturados *in vivo*, dentre os quais podem ser citados a idade da doadora e o protocolo de superestimulação ovariana (Campbell et al., 2007). Já os oócitos maturados *in vitro* têm sido muito utilizados, primeiro, porque geralmente se utilizam ovários oriundos de abatedouros, o que resulta em baixo custo e em significativa quantidade de oócitos e, segundo, porque possibilita um maior controle dos estádios da maturação. Adicionalmente, oócitos para maturação *in vitro* ainda podem ser obtidos *in vivo* por meio da punção folicular de ovários superestimulados (Bordignon et al., 1997; Keefer et al., 2002). Assim, diferentes estudos têm demonstrado a eficiência destes oócitos na produção de blastocistos clones em diferentes espécies, como: caprinos (Baguisi et al., 1999; Zhang et al., 2004), bovinos (Lee et al., 2007), ovinos (Campbell et al., 1996), bubalinos (Meena e Das, 2006) e camelídeos (Sansinena et al., 2003). Em algumas espécies cuja disponibilidade de oócitos é pequena, a possibilidade de utilizar oócitos de outras espécies como citoplastos receptores tem sido o método proposto. Os resultados obtidos usando esta técnica sugerem que os citoplasmas obtidos de uma espécie podem adquirir a competência necessária para atuarem como receptores de núcleos obtidos em uma espécie diferente (Sansinena et al., 2002; Wang et al., 2007).

As condições para a maturação são similares àquelas para a produção *in vitro* (PIV) de embriões, ou seja, meio TCM 199 suplementado com hormônios e antibióticos, mantidos em temperatura de 38,5–39,0°C durante 16–24 h em atmosfera com umidade saturada contendo 5% de CO₂ em ar. Embora meios de maturação sejam suplementados com outros fatores como estradiol, IGF-I e cisteamina, nenhuma diferença na produção de animais saudáveis tem sido verificada (Keefer et al., 2001; Arat et al., 2002; Keefer et al., 2002). Keefer et al. (2001) observaram que oócitos caprinos maturados em TCM199 suplementado com soro de cabra em estro apresentaram uma taxa de maturação superior quando comparados a oócitos maturados em TCM199 acrescido de soro fetal bovino (SFB; 86% vs 69%, respectivamente).

Para utilizar oócitos como citoplastos receptores na técnica de transferência nuclear, o material nuclear deve ser removido, resultando apenas no seu conteúdo citoplasmático. Em geral, este objetivo é atingido por aspiração da placa metafásica de oócitos em MII juntamente com o corpúsculo polar, usando micropipetas acopladas a micromanipuladores (Li et al., 2004). Em muitas espécies, o conteúdo nuclear de oócitos em MII não é facilmente visível por microscopia óptica em virtude da presença de lipídeos citoplasmáticos. Por isso, antes do processo de enucleação, o oócito é marcado com Hoechst 33342, o qual apresenta uma fluorescência em azul quando exposto à luz ultravioleta (UV). Desta maneira, a remoção do material nuclear é confirmada pela ausência de fluorescência no oócito após a enucleação. Contudo, estudos têm demonstrado um efeito negativo da exposição do oócito à luz UV (Velilla et al., 2002), conseqüentemente, tem sido recomendado não expor o citoplasma a esta radiação, mas sim apenas a porção removida presente na pipeta de aspiração (Chesné, 2006).

Uma alternativa para a enucleação de oócitos em MII, a fim de se obter maior eficiência, é a remoção do material nuclear de oócitos ativados em telófase II. A aspiração mecânica de um pequeno volume de citoplasma adjacente à extrusão do segundo corpúsculo polar após a ativação é um método efetivo, não sendo necessário a visualização do DNA pela exposição à luz UV, uma vez que a cromatina ainda permanece justaposta ao segundo corpúsculo polar, (Campbell et al., 2007).

Além do método de enucleação por aspiração mecânica, existe ainda o método químico, o qual consiste

na remoção do material nuclear pelo uso de inibidores de topoisomerase (Hytter et al., 2001). Outra possibilidade é o uso da combinação etanol e demecolcina (Ibáñez et al., 2003). Contudo, citoplastos preparados quimicamente resultam em baixas taxas de clivagem e não produzem um bom desenvolvimento embrionário quando comparados aos métodos de enucleação convencionais (Campbell et al., 2005).

Seleção e cultivo de células doadoras de núcleo

A origem do núcleo doador utilizado para transferência nuclear pode ter efeitos importantes sobre a capacidade de desenvolvimento de embriões reconstruídos até o estágio de blastocisto, bem como sobre o desenvolvimento fetal pós-implantação. Com a obtenção do primeiro mamífero a partir de células embrionárias (Campbell et al., 1996), de linhagens fetais e adultas (Wilmut et al., 1997), numerosas pesquisas foram desenvolvidas evidenciando que células somáticas de diferentes tecidos e idades podem ser utilizadas com sucesso em programas de transferência nuclear (Tab. 2). Estudos indicam que diferentes células doadoras podem ser reprogramadas. Contudo, o modelo celular mais utilizado continua sendo o de fibroblastos obtidos de biópsias de feto ou de animais adultos, da pele ou do músculo (Chesné, 2006).

Tabela 2. Produção de ruminantes pela técnica de transferência nuclear usando diferentes células somáticas.

Espécie	Idade do animal doador	Tipo celular	Referência
Ovinos	Feto	Fibroblasto	Wilmut et al., 1997
	Adulto	Epitélio mamário	Wilmut et al., 1997
Bovinos	Feto	Fibroblasto	Cibelli et al., 1998
	Adulto	Epitélio ovidutário	Kato et al., 1998
Caprinos	Feto	Fibroblasto	Baguisi et al., 1999
	Adulto	Fibroblasto	Lan et al., 2006

Fonte: Adaptado de Campbell et al., 2005.

As células doadoras de núcleo podem ser usadas diretamente após a sua coleta do animal doador (Galli et al., 1999) ou após um período de cultivo (Kubota et al., 2000) antes ou depois da criopreservação. O cultivo prolongado das células doadoras pode alterar a ploidia, estabilidade genômica e provocar modificações nas histonas pós-translação, resultando numa redução da eficiência da técnica (Campbell et al., 2007). As modificações na estrutura da cromatina e alterações epigenéticas são consideradas como os principais fatores determinantes para o sucesso da transferência nuclear (Suteevun et al., 2006).

Estudos realizados em ovinos, bovinos e caprinos demonstraram que células no estágio G_0 do ciclo celular são competentes ao desenvolvimento de embriões reconstruídos por transferência nuclear (Wells et al., 1997; Kato et al., 2000; Keefer et al., 2002; Tibary et al., 2005).

Os carioplastos derivados de amostras celulares podem ser cultivados em meio Dulbecco suplementado com 10% de SFB em condições de 38,5 °C e 5% de CO_2 (Keefer et al., 2002; Hayes et al., 2005). Após duas semanas, os fibroblastos podem ser tripsinizados e semeados em uma nova placa, resultando na passagem 1 (Hill et al., 2001). Após atingir a confluência, estes podem ser ressemeados em outras placas, sendo as células utilizadas para transferência nuclear após três ou quatro passagens. Estas células são mantidas em confluência ou cultivadas em meio suplementado com 0,5% de soro, a fim de aumentar a proporção de células em G_0 e G_1 (Chesné, 2006). As células são preparadas por tripsinização 30 min antes da transferência nuclear, sendo as mesmas lavadas em meio SOF tamponado com HEPES (Lagutina et al., 2007).

Linhagens celulares transfectadas com genes de interesse associada com a transferência nuclear tem se tornado um método viável para introdução de DNA exógeno no genoma de animais (Cibelli et al., 1998). Contudo, uma limitação potencial do uso de fibroblastos adultos transfectados como doadores de núcleo consiste no período de cultivo prolongado necessário para a programação, transfecção, seleção e expansão da linhagem celular. Cada uma destas etapas requer passagens repetidas, bem como períodos de cultivos longos que podem induzir perturbações nas células doadoras, resultando numa redução na eficiência da transferência nuclear (Forsberg et al., 2001).

Reconstrução e cultivo do embrião

Para a reconstrução do embrião após a transferência nuclear, o núcleo de célula doadora (carioplasto) é transferido para o interior de um citoplasma receptor (citoplasto). Cada célula doadora isolada individualmente com base no cultivo prévio é inserida no espaço perivitelino de um oócito enucleado para posterior estimulação com um pulso elétrico, o qual promove a fusão das membranas adjacentes. O pulso elétrico não somente induz a fusão da célula somática com o oócito enucleado para formar um novo complexo, mas também promove uma importante liberação de cálcio intracelular que inicia o processo de ativação (Heyman, 2005).

Em ruminantes, a reconstrução embrionária é geralmente alcançada por eletrofusão, mas esta etapa pode também ser obtida pelo uso de micropipetas por meio da injeção intracitoplasmática da célula intacta ou do

núcleo isolado. Após a fusão, os embriões reconstruídos por transferência nuclear são submetidos à ativação artificial, a qual deve mimetizar o papel exercido pelos espermatozoides durante a fecundação. Na maioria dos mamíferos os oócitos em MII após a ovulação são fecundados. Durante a maturação oocitária, ocorrem uma reorganização e redistribuição específicas de organelas citoplasmáticas, e os oócitos obtêm um complemento de moléculas sinalizadoras (Miyazaki et al., 1993). O evento característico da ativação oocitária é o início das oscilações intracelulares de cálcio, a exocitose de grânulos corticais, o recrutamento de mRNAs, a formação dos pró-núcleos e o início da síntese de DNA (Campbell et al., 2005). Similarmente, na reconstrução embrionária, o citoplasto deve ser ativado para iniciar o subsequente desenvolvimento. De maneira geral, após a transferência de núcleo, a ploidia normal celular é mantida, aguardando a replicação do DNA. O citoplasto receptor que apresenta um alto nível de atividade do (MPF) promove o rompimento da membrana nuclear e a condensação prematura dos cromossomos. A ativação oocitária induz uma redução da atividade da Fator Promotor da Maturação e permite a reconstrução da membrana nuclear. Deste modo, após a replicação do DNA, ocorre a divisão celular no embrião, originando o estágio de duas células.

A ativação consiste na etapa chave do processo de transferência nuclear e pode ser obtida física e/ou quimicamente, por métodos que podem ou não estar diretamente ligados aos níveis de cálcio intracelular. Quanto aos meios físicos, pode ser citada a injeção de cálcio diretamente no citoplasma, promovendo em seguida estímulos elétricos que promoverão a liberação de concentrações intracelulares de cálcio. Os oócitos também podem ser ativados quimicamente por meio da utilização de cálcio ionóforo, A23187 (Cibelli et al., 1998), ionomicina (Hill et al., 2001), ciclohexamida (Keefer et al., 2002) ou 6-dimetilaminopurina (6-DMAP) (Susko-Parrish et al., 1994). Em ruminantes, o uso de cálcio ionóforo seguido por um tratamento com inibidores da atividade de proteínas quinases, tal como a 6-DMAP ou por inibidores de proteínas quinases dependentes de ciclinas por três a seis horas, são os tratamentos mais realizados (Keefer et al., 2002; Sansinena et al., 2003).

Vários estudos têm sido desenvolvidos visando avaliar o efeito do intervalo entre a fusão e a ativação sobre o desenvolvimento embrionário, contudo os resultados são conflitantes. Grupos de pesquisadores têm apontado que o contato prolongado entre oócito receptor e núcleo doador pode ser benéfico para os embriões reconstruídos (Wells et al., 1999; Kato et al., 2000). Wrenzycki et al. (2001) observaram que o padrão de transcrição de blastocistos bovinos é afetado pelo tempo de contato. Adicionalmente, outros fatores influenciam na eficiência da ativação artificial, tais como: concentração dos agentes que promovem a ativação química, período da estimulação, tratamentos posteriores como a citocalasina B ou D, ciclohexamida e 6-DMAP (Campbell et al., 2007). Em ruminantes, diferentes protocolos de ativação mostraram-se eficientes na produção de animais clones (Tab. 3).

Tabela 3. Protocolos de ativação artificial para produção de crias em ruminantes pela técnica de transferência nuclear.

Espécie	Ativação	Pós-fusão	Tratamento pós-ativação	Referência
Bovinos	Ionóforo por 4 min	2-4 h	6-DMAP por 3 h	Cibelli et al., 1998
	Ionóforo por 4 min	4-6 h	6-DMAP por 4 h	Wells et al., 1999
	20 V/mm por 20 μ s	--	Ciclohexamida por 5-6 h	Kato et al., 2000
Caprinos	1,4-1,8 kV/cm por 80 μ s	--	Citocalasina B por 2 h	Baguisi et al., 1999
	Ionomicina por 1 min	30 min	6-DMAP por 2 h	Lan et al., 2006
	Ionóforo por 5 min	2-3 h	6-DMAP por 2,5-4 h	Keefer et al., 2002
Ovinos	1,25 kV/cm por 70 μ s	--	Citocalasina B por 1 h	Wilmot et al., 1997

Fonte: Adaptado de Campbell et al., 2007.

Após a fusão e a ativação, os embriões reconstruídos são cultivados *in vitro* até o estágio de blastocisto, utilizando uma variedade de sistemas de cultivo rotineiramente usados na PIV de embriões, dentre os quais podem ser citados sistemas de cocultivo utilizando células primárias do oviduto ou linhagens celulares estabelecidas (Thompson, 2000). Em geral, o cultivo *in vitro* requer uma suplementação de componentes os quais podem auxiliar no desenvolvimento, mas que, por um período longo de exposição, podem alterar negativamente a qualidade do embrião. Dentre estes componentes podem ser citados: soro fetal bovino, soro de cabra/ovelha em estro, albumina sérica bovina (BSA), fatores de crescimento e vitaminas, entre outros (Keefer et al., 2001; Tibary et al., 2005).

Salamone et al. (2003), trabalhando com transferência nuclear na espécie bovina, verificaram que embriões cultivados em SOF na ausência de cocultivo, porém numa atmosfera de três gases (5% de O₂, 5% de CO₂, 90% de N₂), apresentaram melhores taxas de clivagem e formação de blastocistos quando comparados àqueles tratados em sistemas de cocultivo. Adicionalmente, estudos realizados por Chesné et al. (2003) sugerem que as condições ótimas para o cultivo de embriões bovinos e caprinos consistem em meio B2-INRA-Menezo cocultivado com células do oviduto ou células Vero.

Transferência de embrião reconstruído e fertilidade das receptoras

Em ruminantes, os procedimentos de transferência de embriões podem ser cirúrgicos, semicirúrgicos ou não cirúrgicos. O método cirúrgico ou laparotomia consiste em exteriorizar o corno uterino e depositar os embriões próximos à junção úterotubárica (Baguisi et al., 1999; Keefer et al., 2001). Embriões caprinos cultivados por 35 h até o estágio de quatro células são transferidos cirurgicamente para o interior do oviduto com uma média de cinco embriões por receptora (Chesné et al., 2003). O método semicirúrgico ou semi-laparoscópico é usualmente realizado em caprinos e ovinos (Chesné et al., 2003; Baril, 2006). Em geral, a técnica consiste em associar a laparoscopia a uma pequena incisão sem a necessidade de expor o animal a uma anestesia geral. Finalmente, o método não cirúrgico, frequentemente realizado em bovinos, consiste em inserir, por via transcervical, embriões no corno uterino ipsilateral ao ovário, apresentando pelo menos um corpo lúteo (Cibelli et al., 1998; Chavatte-Palmer et al., 2002).

A taxa de fertilidade de receptoras sincronizadas é variável entre diferentes espécies de ruminantes, bem como entre os grupos de pesquisas. Em bovinos, Cibelli et al. (1998) verificaram que, de um total de 28 embriões transferidos para 11 receptoras, apenas quatro bezerros foram produzidos. Já em lhamas, Sansinena et al. (2003) não observaram nenhum nascimento de 11 embriões transferidos. Keefer et al. (2002), avaliando a eficiência da transferência nuclear em caprinos utilizando fibroblastos fetais e células da granulosa como doadoras de núcleo, de 145 embriões transferidos obtiveram nove animais clones nascidos.

Heyman et al. (2002) avaliaram a evolução da gestação em diferentes grupos de receptoras bovinas que receberam embriões derivados de PIV e transferência nuclear por meio de células embrionárias, fetais e adultas. Estes autores verificaram que as taxas de gestações iniciais foram similares nos diferentes grupos quando avaliaram as concentrações de progesterona plasmáticas no dia 21. Contudo, a frequência de perdas fetais antes dos dois meses foi duas vezes maior nos grupos de receptoras que receberam embriões derivados de células somáticas fetais e adultas, quando comparado às receptoras que receberam embriões derivados de transferência nuclear de células embrionárias e de FIV (Fig. 2).

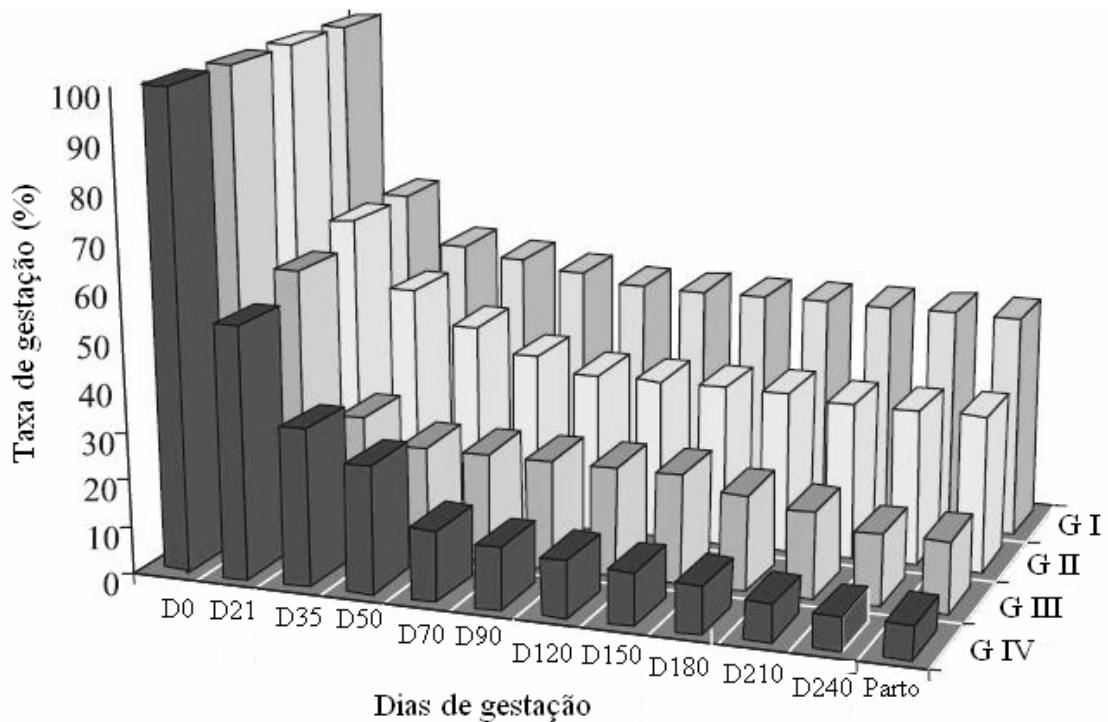


Figura 2. Evolução da gestação em receptoras bovinas após transferência de embriões produzidos *in vitro* (G I), oriundos de células embrionárias (G II), células somáticas fetais (G III) ou células somáticas adultas (G IV). Fonte: Adaptado de Heyman et al., 2002.

Patologias associadas à técnica de TN

Uma das principais contradições dos sistemas de cultivo *in vitro* é que seu aprimoramento é geralmente avaliado sobre o percentual de embriões desenvolvidos até o estágio de blastocistos. No entanto, isto não necessariamente é o melhor indicador da qualidade embrionária, em especial em embriões clones que tendem a apresentar reduzidas taxas de prenhez e significativas taxas de aborto. Estas últimas têm sido descritas em ovinos (De Sousa et al., 2001), lhamas (Sansinena et al., 2003), mas não em caprinos (Baguisi et al., 1999; Keefer et al.,

2002). Contudo, essa baixa taxa de abortos pode estar relacionada ao pequeno número de caprinos clonados ou ao período mínimo de cultivo no qual os embriões reconstruídos são transferidos no estágio de duas a quatro células (Freitas et al., 2007b).

Deste modo, diversas anomalias têm sido constatadas durante a gestação e após o nascimento de animais produzidos pela técnica de transferência nuclear. A baixa eficiência e o desenvolvimento anormal de animais são principalmente em virtude da reprogramação incompleta e da expressão gênica anormal. Dentre as principais anomalias, verificam-se: cardiopatias, placentação anormal, hidroalantoide, deficiência imunológica, disfunção renal, alterações no metabolismo energético e hipertensão pulmonar (Young et al., 1998; Heyman, 2005; Campbell et al., 2007).

Em bovinos, perdas peri-implantacionais são importantes e a proporção de perdas de prenhez neste período pode ser estimada em 50% (Cibelli et al., 1998; Wells et al., 1997). Essas perdas precoces são frequentemente associadas com deficiências funcionais que ocorrem no início da placentação, caracterizada por vascularização anormal de tecidos embrionários e redução no número de placentomas (Heyman, 2005).

A hidroalantoide, a qual é caracterizada pela presença de acúmulo de fluido no alantoide, promove o aumento dos placentomas e do tamanho fetal. Estudos iniciais indicam que, após a transferência nuclear, 27% das gestações após 120 dias desenvolvem hidroalantoide (Oback e Wells, 2003). Tal valor é muito elevado quando comparado em programas de monta ou inseminação artificial (0,02 a 0,6 %; Thibault, 2003).

O elevado peso ao nascimento de crias obtidas pela transferência nuclear caracteriza a síndrome da cria gigante ou LOS (*Large Offspring Syndrome*), a qual foi bem detalhada por Young et al. (1998). Esta síndrome foi inicialmente descrita por Willadsen et al. (1991) em bezerros derivados da transferência nuclear. Quanto às características fenotípicas que identificam esta síndrome, têm-se: aumento do tamanho fetal, aumento da miogênese fetal e disfunção da atividade pulmonar. Além disso, são verificadas anomalias no desenvolvimento da placenta e redução das taxas de gestação (Young et al., 1998).

Posteriormente, a ocorrência da síndrome da cria gigante foi relatada em embriões produzidos por PIV (Sinclair et al., 2000) e embriões obtidos por transferência nuclear de células somáticas (Hill et al., 2001, Kato et al., 2000). Heyman et al. (2002) verificaram que 13,3% de bezerros clones são afetados por esta síndrome, a qual pode estar relacionada a alterações nos padrões epigenéticos associados com a cromatina embrionária durante a pré-implantação (Reik e Walter, 2001; Reik et al., 2003), resultando em alterações na expressão de genes iniciadores e não iniciadores perturbados pelo uso destas biotécnicas (Wrenzycki et al., 1998; Rizos et al., 2003).

Desenvolvimento das crias nascidas

Em geral, a ocorrência da mortalidade pós-natal é observada da 1ª semana ao 4º mês de vida do animal. Nesse período uma grande variedade de problemas tem sido relatada em clones, incluindo infecções, tais como inflamações do rúmen e abomaso (Wells et al., 1998), coccidiose e infecções após traumas (Heyman et al., 2002). A proporção de bezerros clones nascidos que são viáveis ao desenvolvimento normal até a fase adulta é limitada aos 50-70%, de acordo com vários grupos de pesquisas. Chavatte-Palmer et al. (2002) verificaram que, de 59 bezerros clones nascidos, 62% destes desenvolveram-se normalmente até a fase adulta.

As características reprodutivas de novilhas clonadas de células somáticas adultas foram avaliadas quanto à puberdade, dinâmica folicular e perfil hormonal, não sendo observada nenhuma alteração quando da comparação com o grupo controle de animais não clonados (Enright et al., 2002). Lanza et al. (2001) demonstraram que novilhas clonadas são férteis, quer seja usando a monta natural ou inseminação artificial. Usando a técnica de inseminação artificial, estes autores obtiveram uma taxa de concepção de 83% após a primeira inseminação. Adicionalmente, clones bovinos foram avaliados quanto à libido e à produção qualitativa de sêmen, não sendo verificado nenhum efeito negativo sobre tais parâmetros (Heyman et al., 2004).

Enucleação manual (*Handmade cloning*)

Desde seus estudos iniciais, a transferência nuclear não sofreu grandes transformações, contudo modificações visando simplificar os protocolos experimentais, a redução de custos, bem como a melhoria da sobrevivência das crias nascidas vêm sendo adotadas por diferentes grupos de pesquisa. Neste sentido, vários laboratórios vêm adotando a técnica de enucleação manual ou *handmade cloning* (HMC), verificando-se a produção de embriões clones sem a necessidade do uso de micromanipuladores (Vajta et al., 2003). Dentre as vantagens da técnica de enucleação manual quando comparada à técnica clássica, destacam-se: a) o baixo custo, uma vez que não necessita de micromanipuladores para nenhuma fase da transferência nuclear, b) a simplicidade, a rapidez e a facilidade na execução do procedimento.

O princípio básico da técnica consiste em promover a digestão da zona pelúcida de oócitos maturados, para, em seguida, com o auxílio de microlâminas, realizar-se a enucleação manual. As interações citoplastos e núcleos doadores ocorrem pela exposição de tais componentes celulares à fitohemaglutinina (Vajta, 2007). A aplicabilidade deste método já pode ser verificada em diferentes espécies pela produção de embriões clones, tais como a bovina (Vajta et al., 2003) e ovina (Peura, 2003).

Estudos têm verificado que as características qualitativas de embriões bovinos obtidos por meio da técnica de enucleação manual são similares àquelas de embriões produzidos com micromanipulação. Tecirlioglu et al. (2005), comparando a técnica de enucleação manual com a micromanipulação convencional para a produção de clones bovinos, verificaram que tais técnicas apresentam eficiências semelhantes, quanto aos parâmetros de taxa de prenhez, nascimento e sobrevivência das crias. Bhojwani et al. (2005), trabalhando com oócitos bovinos enucleados pela técnica de enucleação manual, verificaram uma taxa de clivagem de 65% e o nascimento de um animal clone.

Considerações finais

Assim, de acordo com o exposto, pode ser verificado que a transferência nuclear de células somáticas em diferentes espécies de ruminantes tem gerado um forte interesse dos setores científicos e produtivos. Contudo, a eficiência da técnica ainda é baixa devido a inúmeros fatores. Desta maneira, pesquisas ainda necessitam ser realizadas objetivando compreender os diversos eventos envolvidos e integrar alternativas que visem simplificar os protocolos experimentais e reduzir os custos relacionados à técnica. Nesta temática, a enucleação manual apresenta-se como uma ferramenta promissora para a obtenção de tais objetivos.

Agradecimentos

À FUNCAP (Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pela concessão da bolsa de estudos à doutoranda Alexandra Fernandes Pereira.

Referências bibliográficas

- Arat S, Gibbons J, Rzucidlo SJ, Respass, DS, Tumlin M, Stice SL.** *In vitro* development of bovine nuclear transfer embryos from transgenic clonal lines of adult and fetal fibroblast cells of the same genotype. *Biol Reprod*, v.66, p.1768-1774, 2002.
- Baguisi A, Behboodi E, Melican DT, Pollock JS, Destrempes MM, Cammuso C, Williams JL, Nims SD, Porter CA, Midura P, Palacios MJ, Ayres SL, Denniston RS, Hayes ML, Ziomek CA, Meade HM, Godke RA, Gavin WG, Overstrom, EW, Echelard Y.** Production of goats by somatic cell nuclear transfer. *Nat Biotechnol*, v.17, p.456-461, 1999.
- Baril G.** Seleção e criopreservação de embriões caprinos e ovinos. In: Freitas VJF (Ed.). *Produção de embriões por transferência nuclear (clonagem)*. Fortaleza: Multicor, 2006. p.21- 29.
- Behboodi E, Chen L, Destrempes MM, Meade HM, Echelard Y.** Transgenic cloned goats and the production of therapeutic proteins. In: Cibelli J, Lanza RP, Campbell KHS, West MD (Ed.). *Principles of cloning*. New York: Academic Press, 2002. p.459-472.
- Berg DK, Li C, Asher G, Wells DN, Oback B.** Red deer cloned from antler stem cells and their differentiated progeny. *Biol Reprod*, v.77, p.384-394, 2007.
- Bhojwani S, Vajta G, Callesen H, Roschlau K, Kuwer A, Becker F, Alm H, Torner H, Kanitz W, Poehland R.** Developmental competence of HMC™ derived bovine cloned embryos obtained from somatic cell nuclear transfer of adult fibroblasts and granulose cells. *J Reprod Dev*, v.51, p.465-475, 2005.
- Bordignon V, Morin N, Durocher J, Bousquet D, Smith LC.** GnRH improves the recovery rate and the *in vitro* developmental competence of oocytes obtained by transvaginal follicular aspiration from superstimulated heifers. *Theriogenology*, v.48, p.291-298, 1997.
- Bordignon V, Smith LC.** Telophase enucleation: an improved method to prepare recipient cytoplasts for use in bovine nuclear transfer. *Mol Reprod Dev*, v.49, p.29-36, 1998.
- Briggs R, King TJ.** Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frogs eggs. *Proc Natl Acad Sci*, v.38, p.455-461, 1952.
- Bromhall JD.** Nuclear transplantation in the rabbit egg. *Nature*, v.258, p.719-162, 1975.
- Campbell KHS, Mcwhir J, Ritchie WA, Wilmut I.** Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature*, v.380, p.64-66, 1996.
- Campbell KHS, Alberio R, Choi I, Fisher P, Kelly RDW, Lee JH, Maalouf W.** Cloning: eight years after Dolly. *Reprod Domest Anim*, v.40, p.256-268, 2005.
- Campbell KHS, Fisher P, Chen WC, Choi I, Kelly RDW, Lee JH, Xhu J.** Somatic cell nuclear transfer: past, present and future perspectives. *Theriogenology*, v.68, p.214-231, 2007.
- Chavatte-Palmer P, Heyman Y, Richard C, Monget P, Lebourhis D, Kann G, Chilliard Y, Vignon X, Renard JP.** Clinical, hormonal and hematological characteristics of bovine calves derived from nuclei from somatic cells. *Biol Reprod*, v.66, p.1596-1603, 2002.
- Chesné P.** Métodos de clonagem em caprinos e ovinos. In: Freitas VJF (Ed.). *Produção de embriões por transferência nuclear (clonagem)*. Fortaleza: Multicor, 2006. p.21-29.
- Chesné P, Perreau C, Lavergne Y, Poulin N, Baril G, Capo D, Bouttier A, Roughel C, Cognié Y, Vignon**



- X, Mermillod P, Heyman Y.** Birth of live offspring from cultured transferred embryos in goats. In: Scientific Meeting of the European Embryo Transfer Association, 19, 2003, Rostock. *Proceedings ...* Rostock: AETE, 2003. p.144. Resumo.
- Cibelli JB, Stice SL, Golueke PJ, Kane JJ, Jerry J, Blackwell C, Ponde de leon A, Robl J.** Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblast. *Science*, v.280, p.1256-1258, 1998.
- De Sousa PA, King T, Harkness L, Young LE, Walker SK, Wilmut I.** Evaluation of gestacional deficiencies in cloned sheep fetuses and placentae. *Biol Reprod*, v.65, p.23-30, 2001.
- Do JT, Hong KH, Lee BY, Kim SB, Lee HT, Chung KS.** In vitro development of reconstructed bovine embryos and fate of donor mitochondria following nuclear injection of cumulus cells. *Zygote*, v.9, p.211-218, 2001.
- Enright B, Taneja M, Schreiber D, Riesen D, Tian XV, Fortune JE, Yang X.** Reproduction characteristics of cloned heifers derived from adult somatic cells. *Biol Reprod*, v.66, p.291-296, 2002.
- Forsberg EJ, Strelchenko NS, Augenstein ML, Betthausen JM, Lange GI, Mallon KS, Bishop MM.** Production of cloned cattle from in vitro systems. *Biol Reprod*, v.67, p.327-333, 2001.
- Freitas VJF.** Transgênese em caprinos. In: Freitas VJF (Ed.). *Produção de embriões por transferência nuclear (clonagem)*. Fortaleza: Multicor, 2006. p.61-70.
- Freitas VJF, Serova IA, Andreeva LE, Dvoryanchikov GA, Lopes-Junior ES, Texeira DIA, Dias LPB, Avelar SRG, Moura RM, Melo LM, Pereira AF, Cajazeiras JB, Andrade MLL, Almeida KC, Sousa FC, Carvalho ACC, Serov OL.** Production of transgenic goat (*Capra hircus*) with human Granulocyte Colony Stimulating Factor (hG-CSF) gene in Brazil. *An Acad Bras Cienc*, v.79, p.585-592, 2007a.
- Freitas VJF, Serova IA, Andreeva LE, Serov OL.** Estado da arte na produção de caprinos transgênicos e clonados. *Acta Sci Vet*, v.35, p.899-904, 2007b.
- Galli C, Duchi R, Moor RM.** Mammalian leukocytes contain all the genetic information necessary for the development of a new individual. *Cloning*, v.1, p.161-170, 1999.
- Gurdon JB, Uehlinger V.** Fertile intestine nuclei. *Nature*, v.210, p.1240-1241, 1966.
- Hayes O, Rodriguez LL, González A, Falcón V, Aguilar A, Castro FO.** Effect of cryopreservation on fusion efficiency and in vitro development into blastocysts of bovine cells lines used in somatic cell cloning. *Zygote*, v.13, p.277-282, 2005.
- Heyman Y.** Nuclear transfer: a new tool for reproductive biotechnology in cattle. *Reprod Nutr Dev*, v.45, p.353-361, 2005.
- Heyman Y, Chavatte-Palmer P, Lebourhis D, Camous S, Vignon X, Renard JP.** Frequency and occurrence of late gestation losses from cattle cloned embryos. *Biol Reprod*, v.66, p.6-13, 2002.
- Heyman Y, Richard C, Rodriguez-Martinez H, Lazzari G, Chavatte-Palmer P, Vignon X.** Zootechnical performance of cloned cattle and offsprings: preliminary results. *Cloning Stem Cells*, v.6, p.111-120, 2004.
- Hill JR, Winger QA, Burghardt RC, Westusin ME.** Bovine nuclear transfer embryo using cells derived from a cloned fetus. *Anim Reprod Sci*, v.68, p.17-26, 2001.
- Hytter P, Laurincik J, Overstrom EW.** Nucleolar protein allocation and ultrastructure in bovine embryos produced by nuclear transfer from embryonic cells. *Cloning*, v.3, p.69-82, 2001.
- Ibáñez E, Albertini DF, Overstrom EW.** Demecolcina-induced oocyte enucleation for somatic cell cloning coordination between cell-stage egress, kinetics of cortical cytoskeletal interactions, and second polar body extrusion. *Biol Reprod*, v.68, p.1249-1258, 2003.
- Kato Y, Tani T, Sotomaru Y, Kurokawa K, Kato J, Doguchi H, Yasue H, Tsunoda Y.** Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science*, v.282, p.2095-2098, 1998.
- Kato Y, Tani T, Tsunoda Y.** Cloning of calves from various somatic cell types of male and female adult, newborn and fetal cows. *J Reprod Fertil*, v.120, p.231-237, 2000.
- Keefer CL, Baldassarre H, Keyston R, Wang B, Bhatia B, Bilodeau AS, Zhou JF, Leduc M, Downey BR, Lazaris A, Karatzas CN.** Generation of dwarf goat (*Capra hircus*) clones following nuclear transfer with transfected and non-transfected fetal fibroblasts and in vitro-matured oocytes. *Biol Reprod*, v.64, p.849-856, 2001.
- Keefer CL, Keyston R, Lazaris A, Bhatia B, Begin I, Bilodeau AS, Zhou FJ, Kafidi N, Wang B, Baldassarre H, Karatzas CN.** Production of cloned goats after nuclear transfer using adult somatic cells. *Biol Reprod*, v.66, p.199-203, 2002.
- Kubota C, Yamakuchi H, Todoroki J, Mizoshita K, Tabara N, Barber M, Yang X.** Six cloned calves produced from adult fibroblast cells after long-term culture. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.97, p.990-995, 2000.
- Lagutina I, Lazzari G, Duchi R, Turini P, Tessaro I, Brunetti D, Colleoni S, Crotti G, Galli C.** Comparative aspects of somatic cell nuclear transfer with conventional and zona-free method in cattle, horse, pig and sheep. *Theriogenology*, v.67, p.90-98, 2007.
- Lan GC, Chang ZL, Luo MJ, Jiang YL, Han D, Wu YG.** Production of cloned goats by nuclear transfer of cumulus cells and long-term cultured fetal fibroblast cells into abattoir-derived oocytes. *Mol Reprod Dev*, v.73, p.834-840, 2006.
- Lanza RP, Cibelli JB, Moraes CT, Farin PW, Farin CE, Hammer M, West MD, Damiani P.** Cloning of an

- endangered species (*Bos gaurus*) using interspecies nuclear transfer. *Cloning*, v.2, p.79-90, 2000.
- Lanza RP, Cibelli JB, Faber D, Sweeney RW, Henderson B, Navala W, West MD, Wettstein PJ.** Cloned cattle can be normal and healthy. *Science*, v.294, p.1893-1894, 2001.
- Lee SH., Kumar BM, Kim JG, Ock SA, Jeon BG, Balasubramanian S, Choe SY, Rho GH.** Cellular composition and viability of cloned bovine embryos using exogene-transfected somatic cells. *Reprod Domest Anim*, v.42, p.44-52, 2007.
- Li GP, White KL, Bunch TD.** Review of enucleation methods and procedures used in animal cloning: state of the art. *Cloning Stem Cells*, v.6, p.5-13, 2004.
- Meena CR, Das SK.** Development of water buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos from *in vitro* matured oocytes reconstructed with fetal skin fibroblast cells as donor nuclei. *Anim Reprod Sci*, v.93, p.258-267, 2006.
- Miyazaki S, Shirakawa H, Nakada K, Honda Y.** Essential role of the inositol 1,4,5-triphosphate receptor/ Ca^{2+} release channel in Ca^{2+} waves and Ca^{2+} oscillations at fertilization of mammalian eggs. *Dev Biol*, v.158, p.62-78, 1993.
- Oback B, Wells D.** Cloning cattle. *Cloning Stem Cells*, v.5, p.243-256, 2003.
- Ohkoshi K, Takahashi S, Koyama SI, Akagi S, Adagi S, Adachi N, Furusawa T, Fujimoto JI, Izaike Y, Tokunaga T.** Caprine somatic cell number transfer using *in vivo* matured oocytes collected by laparoscopic follicular aspiration. *Anim Sci*, v.74, p.269-276, 2003.
- Peura TT.** Improved *in vitro* development rates of sheep somatic nuclear transfer embryos by using a reverse-order zona-free cloning method. *Cloning Stem Cells*, v.5, p.13-24, 2003.
- Prather RS, Barnes FL, Sims MM, Robl JM, Eystone WH, Fist NL.** Nuclear transplantation in the bovine embryo: assessment of donor nuclei and recipient oocyte. *Biol Reprod*, v.37, p.859-866, 1987.
- Prather RS, First NL.** Cloning embryos by nuclear transfer. *J Reprod Fertil*, v.41, p.125-134, 1990.
- Reik W, Walter J.** Genomic imprinting: parental influence on the genome. *Nat Rev Genet*, v.2, p.21-32, 2001.
- Reik W, Santos F, Dean W.** Mammalian epigenomics: reprogramming the genome for development and therapy. *Theriogenology*, v.59, p.21-32, 2003.
- Rizos D, Gutierrez-Adan A, Perez-Garnelo S, DeLaFuente J, Boland MP, Lonergan P.** Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. *Biol Reprod*, v.68, p.236-243, 2003.
- Salamone DF, Santos CB, Baranão JL, Bussmann L, Artuso J, Valdez A, Munar C, Werning C, Melo C.** Effect of different culture systems, donor cell origin and roscovitine treatment of recipient oocytes in bovine cloning. *Theriogenology*, v.59, p.285, 2003.
- Sansinena MJ, Reggio BC, Denniston RS, Godke RA.** Nuclear transfer embryos from different equine cell lines as donor karyoplasts using the bovine oocyte as recipient cytoplasm. *Theriogenology*, v.58, p.775-777, 2002.
- Sansinena MJ, Taylor SA, Taylor PJ, Denniston RS, Godke RA.** Production of nuclear transfer llama (*Lama glama*) embryos from *in vitro* matured llama oocytes. *Cloning Stem Cells*, v.5, p.191-198, 2003.
- Shin D, Lu F, Wei Y, Cui K, Yang S, Wei J, Msevoy TG.** Buffaloes (*Bubalus bubalis*) cloned by nuclear transfer of somatic cells. *Biol Reprod*, v.77, p.285-291, 2007.
- Sinclair KD, Young LE, Wilmut I, Msevoy TG.** In utero overgrowth in ruminants following embryo culture: lessons from mice and a warning to men. *Hum Reprod*, v.5, p.68-86, 2000.
- Spermann H.** *Embryonic development and induction*. New York: Hafner, 1938. p.210-211.
- Susko-Parrish JL, Leibfried-Rutledge ML, Northey DL, Schuetzkus V, First NL.** Inhibition of protein kinases after an induced calcium transient causes transition of bovine oocytes to embryonic cycles without meiotic completion. *Dev Biol*, v.166, p.729-739, 1994.
- Suttevun T, Parnpai R, Smith SL, Chang C, Muenthaisong S, Tian XC.** Epigenetic characteristics of cloned and *in vitro*-fertilized swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos. *J Anim Sci*, v.84, p.2065-2071, 2006.
- Tecirlioglu RT, Cooney MA, Lewis IM, Korfiatis NA, Hodgson R, Ruddock NT, Vajta G, Downie S, Trounson AO, Holland MK, French AJ.** Comparison of two approaches to nuclear transfer in the bovine: hand-made cloning with modifications and the conventional nuclear transfer technique. *Reprod Fertil Dev*, v.17, p.573-85, 2005.
- Thibault C.** Recent data on the development of cloned embryos derived from reconstructed eggs with adult cells. *Reprod Nutr Dev*, v.43, p.303-324, 2003.
- Thompson JG.** *In vitro* culture and embryo metabolism of cattle and sheep embryos- a decade of achievement. *Anim Reprod Sci*, v.60/61, p.263-275, 2000.
- Tibary A, Anouassi A, Khatir H.** Update on reproductive biotechnologies in small ruminants and camelids. *Theriogenology*, v.64, p.618-638, 2005.
- Vajta G.** Handmade cloning: the future way of nuclear transfer? *Trends Biotechnol*, v.25, p.250-253, 2007.
- Vajta G, Lewis IM, Trounson AO, Puruo S, Maddox-Hyttle P, Sschmidt M, Pedersen HG, Greve T, Callesen H.** Handmade somatic cell cloning in cattle: analysis of factors contributing to high efficiency *in vitro*. *Biol Reprod*, v.68, p.571-578, 2003.
- Vellilla E, López-Béjar M, Rodríguez-González E, Vidal F, Paramio MT.** Effect of Hoechst 33342 staining

- on developmental competence of prepubertal goat oocytes. *Zygote*, v.10, p.201-208, 2002.
- Wang L, Peng T, Zhuh H, Lv Z, Liu T, Shuai Z, Gao H, Cai T, Cao X, Wang H.** *In vitro* development of reconstructed ibex (*Capra ibex*) embryos by nuclear transfer using goat (*Capra hircus*) oocytes. *Theriogenology*, v.73, p.135-141, 2007.
- Wells DN, Misica PM, Day TA, Tervit HR.** Production of cloned lambs from an established embryonic cell line: a comparison between *in vivo*- and *in vitro*-matured cytoplasts. *Biol Reprod*, v.57, p.385-393, 1997.
- Wells DN, Misica PM, Tervit HR, Vivanco WH.** Adult somatic cell nuclear transfer is used to preserve the last surviving cow of the Enderby Island cattle breed. *Reprod Fertil Dev*, v.10, p.369-378, 1998.
- Wells DN, Misica PM, Day TA, Tervit HR.** Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells. *Biol Reprod*, v.60, p.996-1005, 1999.
- Willadsen SM.** Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature*, v.320, p.63-65, 1986.
- Willadsen SM, Janzen RE, Mcalister RJ, Shea BF, Hamilton G, Mcdermand D.** The viability of late morulae and blastocysts produced by nuclear transplantation in cattle. *Theriogenology*, v.35, p.161-170, 1991.
- Wilmot I, Schnieke AE, Mcwhir J, Kind AJ, Campbell KHS.** Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, v.385, p.810-813, 1997.
- Wrenzycki C, Herrmann D, Carnwath JW, Niemann H.** Expression of RNA from developmentally important genes in preimplantation bovine embryos produced in TCM supplemented with BSA. *J Reprod Fertil*, v.112, p.387-398, 1998.
- Wrenzycki C, Wells D, Herrmann D, Miller A, Oliver J, Tervit R, Niemann H.** Nuclear transfer protocol affects messenger RNA expression patterns in cloned bovine blastocysts. *Biol Reprod*, v.65, p.309-317, 2001.
- Young LE, Sinclair KD, Wilmot I.** Large offspring syndrome in cattle and sheep. *Rev Reprod*, v.3, p.155-263, 1998.
- Zhang LS, Jiang MX, Lei ZL, Li RC, Sang D, Sun QY, Chen DY.** Development of goat embryos reconstituted with somatic cells: the effect of cell-cycle coordination between transferred nucleus and recipient oocytes. *J Reprod Dev*, v.50, p.661-666, 2004.
- Zhou H, Liu C, Wang W.** Heterospecific nuclear-transferred embryos derived from equine fibroblast cells and enucleated bovine oocytes. *Reprod Domest Anim*, v.42, p.243-247, 2007.
- Zou X, Chen Y, Wang Y, Luo J, Zhan Q, Zhang X, Yang Y, Ju H, Shen Y, Lao W, Xu S, Du M.** Production of cloned goats from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei or fused with cumulus cells. *Cloning*, v.3, p.31-37, 2001.
-